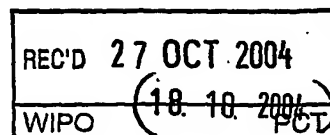


PCT/EP200 4 / 0 5 1 7 2 6



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

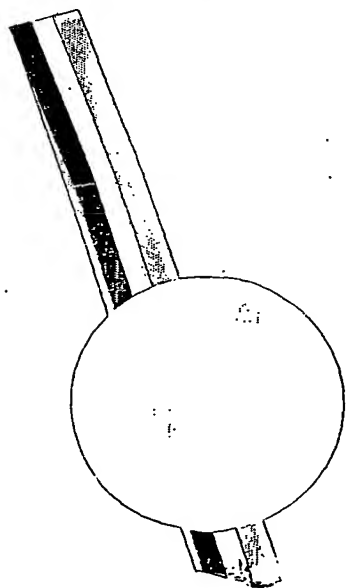
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000386 del 05.08.2003**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma li... **3 SET. 2004**



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

E. Marinelli

Sig.ra E. MARINELLI



Rest Available Copy

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (1)

ISTIT. NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE "LAZZARO SPALLANZANI" IRCCS

N.G.

1) Denominazione

Residenza

Via Portuense, 292 - ROMA

codice

05080991002

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome

Dr.ssa Primiceri Maria Vittoria ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A

via

Savoia

n.

82

città

Roma

cap

00198

(prov.)

RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

come sopra

n.

città

cap

(prov.)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

"Metodo e test diagnostici basati sull'analisi citofluorimetrica dei linfociti T antigene-specifici."

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1)

POCCIA Fabrizio

3)

AGRATI Chiara

2)

GIOIA Cristiana

4)

MONTESANO Carla

F. PRIORITÀ

nazione e organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

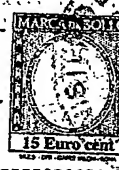
nessuna

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)

PROV

n. pag

137

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2)

PROV

n. tav.

193

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3)

RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4)

RIS

designazione inventore

Doc. 5)

RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6)

RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7)

RIS

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

Euro duecentonovantuno/80

obbligatorio

COMPILATO IL 04/08/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri della

CONTINUA SU/NO

SI

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

CAMERA DI COMMERCIO I.A.A. DI

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2003 A 000386

ROMA

codice

58

L'anno millesimo: Duemilatre

il giorno Cinque

del mese di Agosto

(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Lunio Balobessa

UFFICIALE ROGANTE
Antonio Salvo

4359 PRT

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 101 di totali 101

DOMANDA N° 2003 A 000398 REG. A

AGGIUNTA MODULO A

N.B.

A. RICHIEDENTE (1)

<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			
<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			
<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			
<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			
<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			
<input type="checkbox"/>	Denominazione		codice	
<input type="checkbox"/>	Residenza			

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 AMICOSANTE Massimo	
06 CASETTI Rita	
07 D'OFFIZI Gianpiero	
08 HOREJSH Douglas	
09 MARTINI Federico	
10 CAPOBIANCHI Maria Rosaria	
11 PUCILLO Leopoldo Paolo	
12 PERRONE Donnorso Raffaele	
13 IPPOLITO Giuseppe	

F. PRIORITA

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
<input type="checkbox"/> nessuna				
<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/>				
<input type="checkbox"/>				

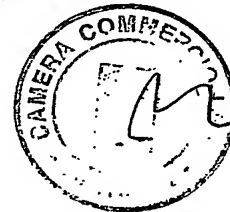
SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE (1)

Dr.ssa Maria Vittoria PRIMICERI della NOTARBAROLO & GERVASI S.p.A.

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI



4359PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

RM 2003 A 000386

DATA DI DEPOSITO

05/08/2003

DATA DI RILASCIO

/ /

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

D. TITOLO

Metodo e test diagnostici basati sull'analisi citofluorimetrica dei linfociti T
antigene-specifici.

Classe proposta (sez./cl./scf/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive un metodo rapido per la determinazione della risposta immune verso antigeni associati a qualsiasi patologia ad eziologia infettiva, neoplastica o autoimmune. Il metodo è basato sull'analisi citofluorimetrica dei linfociti T Antigene-Specifici (Ag-Sp) e può essere fornito come un insieme di reattivi pronti per l'uso in un kit diagnostico specifico per la patologia in esame. La lettura dei risultati richiede l'impiego di un citofluorimetro comunemente utilizzato per la tipizzazione dei linfociti nei laboratori di patologia clinica.



DISEGNO

4359PTIT

Notarbartolo & Gervasi SpA

Descrizione

RM 2003 A 000386

della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

"Metodo e test diagnostici basati sull'analisi citofluorimetrica dei linfociti

T antigene-specifici".

a nome di ISTITUTO NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE

"LAZZARO SPALLANZANI" - IRCCS

con sede in Via Portuense 292; 00149 Roma

Inventori designati: POCCIA Fabrizio, GIOIA Cristiana, AGRATI Chiara,

MONTESANO Carla, AMICOSANTE Massimo, CASETTI Rita, D'OFFIZI

Gianpiero, HOREJSH Douglas, MARTINI Federico, CAPOBIANCHI

Maria Rosaria, PUCILLO Leopoldo Paolo, PERRONE Donnorso

Raffaele, IPPOLITO Giuseppe

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad un metodo e relativi test diagnostici per eseguire una immunodiagnosi la determinazione della risposta immune verso antigeni associati a tutte quelle patologie che coinvolgono il sistema immunitario attraverso i linfociti T. Il test si basa sull'analisi citofluorimetrica dei linfociti T antigene-specifici (anche detti linfociti T Ag-Sp).

Arte nota

I test di immunodiagnosi di uso comune (Pizzocolo G. et al. Ann. Ist. Super. Sanità 1995; 31:123-129) si basano sulla determinazione degli anticorpi antigene-specifici prodotti dai linfociti B e presenti nel siero. Tuttavia, i saggi sui linfociti B non danno risultati prima di due settimane

dall'esposizione all'antigene, tempo minimo necessario per l'attivazione dei linfociti B, ed in alcuni casi sono necessari alcuni mesi per poter ottenere un risultato significativo.

Alcuni test in vitro sono stati recentemente messi a punto per la misurazione dell'immunità cellulo-mediata che si manifesta dopo 7-10 giorni dall'esposizione all'antigene. I metodi utilizzati per analizzare la presenza di cellule antigene specifiche già descritti durano alcuni giorni e sono preferenzialmente basati su dosaggi ELISA (es. brevetto WO02059605), o sul rilevamento della proliferazione cellulare (es. WO0011476). Inoltre, entrambi gli approcci danno risultati esclusivamente qualitativi in quanto forniscono una informazione sulla capacità di riconoscere l'antigene senza però permettere di quantificare la frequenza di cellule che rispondono alla stimolazione con l'antigene. Inoltre, nei brevetti WO02059605 e WO8705400 viene descritto un metodo per valutare su sangue intero la presenza di cellule specifiche verso antigeni di *M. tuberculosis*. Tuttavia, l'impiego di sangue intero riduce la sensibilità del metodo, la cui durata è comunque sempre superiore a 4 giorni.

Diversamente, nella presente invenzione:

- è utilizzato un metodo rapido di separazione dei linfociti circolanti dal campione di sangue aumentando così la sensibilità del test senza dilatare i tempi di analisi;
- il test può essere eseguito in una giornata (con tempi al di sotto delle 24 ore, anche al di sotto delle 8 ore) ed è efficace anche utilizzando campioni criopreservati;

- i risultati del test sono sia qualitativi che quantitativi e possono essere espressi come frequenza o valore assoluto di linfociti T Ag-Sp presenti nel sangue periferico.

Sommario dell'invenzione

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione un test di immunodiagnosi per la determinazione della risposta immune verso antigeni associati a tutte quelle patologie che coinvolgono il sistema immunitario attraverso i linfociti T tramite l'analisi quantitativa dei linfociti T Antigene-Specifici (nel seguito Ag-Sp). Questo test impiega un metodo rapido per la misurazione selettiva dei linfociti T Ag-Sp che vengono identificati tramite: a) anticorpi monoclonali che si legano sulla superficie cellulare dei linfociti T e delle loro sottopopolazioni; b) anticorpi monoclonali che si legano alle citochine che si accumulano a livello intracellulare in seguito alla stimolazione con l'antigene; miscele di a) e b). L'analisi citofluorimetria della presenza contemporanea dei marcatori di differenziamento dei linfociti T e dell'accumulo di citochine a livello intracitoplasmatico permette così di ottenere dei risultati sia qualitativi che quantitativi. Il test diagnostico oggetto della presente invenzione viene eseguito utilizzando sangue venoso ed è composto da un semplice kit di reattivi che richiedono per la lettura dei risultati la disponibilità di un citofluorimetro comunemente utilizzato nei laboratori di analisi per la quantificazione dei linfociti T, B e NK. Ulteriori oggetti dell'invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata che segue.

Breve descrizione delle Figure

La Figura 1 descrive la procedura di esecuzione del test di immunodiagnosi tramite l'analisi quantitativa dei linfociti T Ag-Sp.

La Figura 2 descrive i risultati ottenuti tramite l'impiego di diversi stimoli Ag-Sp, quali un estratto antigenico crudo, una proteina ricombinante o una miscela di peptidi.

La Figura 3 descrive i risultati dell'applicazione del test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp per valutare l'efficacia della vaccinazione al vaiolo e l'esposizione naturale all'infezione da citomegalovirus.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione riguarda l'esecuzione di un test di immunodiagnosi basato sulla quantificazione dell'immunità antigene-specifica mediata dai linfociti T (che compaiono dopo 7-10 giorni dall'esposizione all'antigene). Il test può essere effettuato su campioni di sangue venoso umano o animale.

Il metodo della presente invenzione richiede l'impiego di una preparazione antigene specifica (Ag-Sp) (nel seguito anche preparazione Ag-Sp) per la patologia in esame. Le preparazioni Ag-Sp possono essere classificate in tre categorie principali, a seconda del livello di purificazione e di selezione dell'antigene: estratti proteici crudi, proteine purificate o ricombinanti e miscele di peptidi. Per eseguire il test è necessario aggiungere la preparazione Ag-Sp a cellule mononucleate (PBMC) isolate da sangue venoso tramite centrifugazione rapida su gradiente. Tale metodologia di isolamento dei PBMC è nota



ed alla portata dell'esperto del ramo. Tra i diversi metodi diffusi i prodotti migliori per gli scopi dell'invenzione sono i seguenti: LeucoSep™, Arnika, Milano; BD Vacutainer™ CPT™ Becton-Dickinson, CA. Dopo alcune ore di incubazione si esegue l'analisi qualitativa e quantitativa dei linfociti T specifici per la patologia in esame, utilizzando una metodica di rilevamento della frequenza di cellule che producono citochine tramite citofluorimetria.

La colorazione delle citochine intracellulari prodotte dai linfociti T tramite citofluorimetria è una tecnologia nota (Amicosante M, et al. Mol Med. 2002;8:798-807) che può essere facilmente automatizzata utilizzando la strumentazione di comune impiego nei laboratori di patologia clinica.

Il test citofluorimetrico secondo l'invenzione può essere eseguito su cellule mononucleate del sangue periferico appena isolate o su campioni opportunamente criopreservati. L'intera procedura di esecuzione del test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp è schematizzata nella Figura 1 e comprende le seguenti fasi:

- i. isolamento delle cellule mononucleate (PBMC) da sangue venoso
- ii. stimolazione con la preparazione Ag-Sp
- iii. incubazione
- iv. colorazione in immunofluorescenza
- v. acquisizione ed analisi al citofluorimetro
- vi. elaborazione della risposta diagnostica.

Per lo stadio (i), le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono isolate da un'aliquota di sangue venoso eparinato (tipicamente

7ml) tramite centrifugazione su gradiente di densità utilizzando un metodo rapido (come descritto in precedenza) in genere basato sull'impiego di tubi cosiddetti con filtro per la separazione dei leucociti.

Per quanto concerne lo stadio (ii), la metodologia secondo l'invenzione prevede l'allestimento di due tubi di controllo, uno non stimolato (controllo negativo) e uno con stimolo mitogenico (controllo positivo) e uno o più tubi contenenti una preparazione antigene-specifica (Ag-Sp) a seconda delle analisi da eseguire.

Il controllo negativo è in genere costituito da uno stimolo di controllo (es. estratto antigenico da colture non infette, proteina ricombinante irrilevante o terreno di diluizione dei peptidi). Il controllo positivo può essere costituito da mitogeni, quali per esempio ionomicina e PMA, in modo da indurre un forte segnale di attivazione facilmente rilevabile in citofluorimetria.

Il controllo negativo, il controllo positivo e le preparazioni Ag-Sp possono essere preparazioni liofilizzate da risospendere al momento dell'impiego. Come descritto in dettaglio negli esempi, le preparazioni Ag-Sp possono essere composte da 3 categorie di antigeni a seconda del livello di purificazione e sono scelte in funzione delle esigenze e del tipo di analisi da eseguire: estratti proteici crudi, proteine purificate o ricombinanti e miscele di peptidi.

Nello stadio (iii), i campioni da esaminare sono ottenuti ponendo in contatto le PBMC con la preparazione Ag-Sp prescelta, vengono quindi incubati in genere a circa 37 °C con tempi in genere di circa un'ora seguita da ulteriori circa 5 ore in presenza di un potente inibitore della

secrezione cellulare, come ad esempio Brefeldin-A.

Nello stadio (iv), viene eseguita la colorazione in immunofluorescenza delle colture di controllo o stimulate con la preparazione Ag-Sp secondo tecniche note (Amicosante M, et al. Mol Med. 2002;8:798-807). Per la misurazione selettiva dei linfociti T Ag-Sp si impiegano: a) anticorpi monoclonali che si legano sulla superficie cellulare dei linfociti T e delle loro sottopopolazioni; b) anticorpi monoclonali che si legano alle citochine che si accumulano a livello intracellulare in seguito alla stimolazione con l'antigene; miscele di a) e b). Per discriminare i linfociti T, le cellule sono colorate con la mix di anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni presenti sulla superficie dei linfociti T (es. tipicamente CD3 e CD45 e relative miscele). Gli anticorpi preferibilmente utilizzati per definire singole sottopopolazioni o differenti stadi di differenziazione ed attivazione dei linfociti T sono tipicamente anti-CD3 ed anti-CD45 e relative miscele quale configurazione minima, a cui sostituire o aggiungere uno o più scelti fra anti- CD4, CD8, CD25, CD27, CD38, CD45-RA, CD45-RO, CD69, CCR5, CCR7.

Per determinare la risposta alla stimolazione, vengono impiegati degli anticorpi specifici per l'IFN- γ a livello intracellulare per valutare la produzione di questa citochina in seguito allo stimolo antigenico. Per quanto riguarda la produzione di citochine intracellulari quale segnale di attivazione, la valutazione della presenza di interferone-gamma (IFN- γ) può essere sostituita dall'analisi della produzione di IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES.

Per quanto riguarda lo stadio (v), i campioni vengono acquisiti ed

analizzati al citofluorimetro con un settaggio strumentale costante, ottenuto mediante un'attenta calibratura quotidiana dello strumento mediante biglie fluorescenti, utilizzando procedure comuni che sono alla portata di un esperto del ramo. L'analisi citofluorimetria della presenza contemporanei dei marcatori di differenziamento dei linfociti T e dell'accumulo di citochine a livello intracitoplasmatico permette così di ottenere dei risultati sia qualitativi che quantitativi.

Infine, stadio (vi), la risposta del test è espressa sia a livello qualitativo (presenza/assenza di linfociti T Ag-Sp) che quantitativo (percentuale e frequenza per mmc di sangue), come descritto in maniera dettagliata negli esempi. I limiti di sensibilità del citofluorimetro permettono di rilevare differenze percentuali sino allo 0,02%. In ogni caso, è raccomandabile eseguire un'analisi per la definizione dell'intervallo di normalità in ogni laboratorio.

Il saggio citofluorimetrico secondo l'invenzione può essere condotto con la realizzazione di un kit i cui componenti base, eventualmente ove necessario o possibile in forma liofilizzata, sono:

- preparazione Ag-Sp e relative preparazioni di controllo negativo e positivo
- reagenti quali soluzioni di lavaggio e permeabilizzazione
- reagenti quali miscele di anticorpi monoclonali
- pipette e altro materiale da laboratorio
- istruzioni per la conduzione del test

Il saggio di immunodiagnosi secondo l'invenzione può essere impiegato per il monitorare al comparsa o la riacutizzazione di tutte quelle malattie



infettive, autoimmuni o neoplastiche che coinvolgono il sistema immunitario attraverso i linfociti T. Dato che l'induzione di un'efficace risposta dei linfociti T richiede solo alcuni giorni e precede di alcune settimane la comparsa di anticorpi titolabili, la metodologia di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp descritta nella presente invenzione presenta i seguenti vantaggi: a) la frequenza dei linfociti T Ag-Sp è correlabile all'esposizione antigenica ed è quindi utile, ad esempio, a evidenziare l'esposizione subclinica ad un agente infettivo; b) elevati livelli di linfociti T Ag-Sp sono presenti durante una fase acuta di malattia, e la loro assenza o ricomparsa può essere un indice di risoluzione o recidiva della patologia; c) il monitoraggio dei linfociti T Ag-Sp è utile per valutare l'efficacia di un protocollo di chemioterapia o di vaccinazione.

La procedura di esecuzione del test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp, l'elaborazione dei risultati in una risposta diagnostica e gli aspetti relativi alle caratteristiche delle preparazioni antigeniche sono descritti in dettaglio negli esempi seguenti, che servono ad illustrare la presente invenzione e non sono da considerare limitativi dello scopo della medesima.

Esempio 1: Procedura di esecuzione del test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp tramite citofluorimetria.

I seguenti anticorpi monoclonali specifici per antigeni umani vengono utilizzati per l'esecuzione del test: anti-CD28 e anti-CD49d purificati per colture cellulari; anti-IFNgamma coniugato con fluoresceina (FITC); anti-CD3 coniugato con ficoeritrina (PE); anti-CD45 coniugato con la

cianina-5-ficoeritrina (Cy-5); ed un controllo isotipico (IgG1) coniugato con FITC. Gli anticorpi vengono utilizzati alla concentrazione di 0,25 μ g/ml. Ogni nuovo lotto di anticorpi viene testato e gli anticorpi vengono aliquotati in tubi "eppendorf" nelle diverse miscele (mix). In particolare, ciascun anticorpo viene testato e utilizzato in condizioni di saturazione, per escludere differenze tra campioni nella colorazione. I tubi vengono poi posti nel liofilizzatore (Speedvac) fino a completa evaporazione del liquido (20 min). Al momento dell'uso ciascuna mix viene ricostituita mediante l'aggiunta di soluzione salina, e aggiunta al tubo contenente le cellule da analizzare.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono isolate da 7ml di sangue venoso tramite centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque, Pharmacia, Uppsala, Sweden) utilizzando un metodo rapido basato sull'impiego di tubi per la separazione dei leucociti da 14ml con filtro (LeucoSepTM, ARNIKA, Milano). Dopo avere eseguito 2 lavaggi in PBS 1x, il pellet viene risospeso in 3 ml di terreno completo (RPMI 1640 with HEPES 25mM, 10% v/v FCS, 2 mM L-Glutamina, 10 U/ml penicillina/streptomicina). A questa procedura corrisponde una concentrazione cellulare di circa $0,5-2 \times 10^6$ cellule/ml. Vengono quindi aliquotati 500 μ l della sospensione cellulare in terreno completo nei tubi Eppendorph. Si devono allestire due tubi di controllo (non stimolato e con stimolo mitogenico) e uno o più tubi contenenti una preparazione antigene-specifica (Ag-Sp) a seconda delle analisi da eseguire. Per controllare la produzione spontanea di citochine, le cellule incubate con i soli costimoli anti-CD28 and -CD49d sono incluse in ogni test (controllo

non stimolato). Il rilascio di IFN-gamma indotto dalla PMA (50 ng/ml) + ionomicina (10 µg/ml) è utilizzato come controllo positivo. Sia il controllo negativo che il controllo positivo sono preparazioni liofilizzate da risospendere al momento dell'impiego. I campioni vengono quindi incubati a 37 °C per un ora seguita da ulteriori 5 ore in presenza di 10 µg/ml di Brefeldin-A (Sigma, St. Louis, MO), un potente inibitore della secrezione cellulare.

Per eseguire la colorazione in immunofluorescenza, le colture di controllo o stimulate con la preparazione Ag-Sp sono poi lavate in tampone dPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, dPBS) contenente l' 1% di albumina serica bovina (bovine serum albumin, BSA) e lo 0,1% di sodio azide. Le cellule sono state lavate due volte in PBS, BSA 1%, e sodio azide 0,1% e colorate con la mix di anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni di membrana (CD3 e CD45) precedentemente descritti per 15 min a 4°C. I campioni sono poi fissati in paraformaldeide 1% per 10 minuti a temperatura ambiente, ed incubati in presenza di anticorpi specifici per l'IFN-gamma diluiti in una soluzione tampone composta da dPBS 1X, BSA 1% e saponina 0,5%. Infine, le cellule vengono lavate due volte in tampone dPBS 1X, BSA 1%, saponina 0,1% e risospese in BPS filtrato prima di essere acquisite tramite un citofluorimetro (es. FACScalibur, Becton Dickinson, CA). Il controllo della colorazione non specifica viene eseguito tramite anticorpi monoclonali dello stesso isotipo e l'eventuale presenza di colorazione non specifica è sempre sottratta dai risultati.

I campioni vengono poi analizzati al citofluorimetro utilizzando un

settaggio strumentale costante, ottenuto mediante un'attenta calibratura quotidiana dello strumento mediante biglie fluorescenti. Per ogni campione vengono acquisiti 1×10^5 eventi presenti nella regione dei linfociti CD45+, per garantire un'adeguata rappresentazione di tutte le sottopopolazioni cellulari, permettendo così di effettuare analisi statistiche significative, necessarie per l'elaborazione della risposta a scopo diagnostico.

Esempio 2: Elaborazione dei risultati e formulazione di una risposta diagnostica.

I risultati dei test eseguiti utilizzando diversi stimoli Ag-Sp sono riportati in Figura 2. In particolare, sono riportati i pannelli citofluorimetrici relativi al controllo positivo ed al controllo negativo (pannelli A-B) e alla stimolazione con un estratto antigenico crudo del citomegalovirus (CMV, pannelli C-D), con la proteina GAG ricombinante del virus dell'immunodeficienza umana (HIV, pannelli E-F) o con una miscela di peptidi di HIV GAG (pannelli G-H). I pannelli riportano in ordinata la presenza di IFN-gamma all'interno delle cellule quale segnale di attivazione. In ascissa è riportata l'espressione di membrana delle molecole specifiche dei linfociti T CD3 ed in alcuni casi CD8, a sottolineare che uno dei vantaggi di questa applicazione diagnostica è la possibilità di eseguire il test in maniera specifica a livello dei linfociti T ed anche all'interno di determinate sottopopolazioni cellulari (es. CD4, CD8). Il controllo negativo è costituito da uno stimolo di controllo (es. estratto antigenico da colture non infette, proteina ricombinante irrilevante o terreno di diluizione dei peptidi) e nel caso specifico



riportato nel pannello A è costituito da un lisato antigenico crudo di fibroblasti non infetti. Il controllo positivo è invece costituito da ionomicina e PMA in modo da indurre un forte segnale di attivazione facilmente rilevabile in citofluorimetria (nel caso specifico da un segnale superiore al 15% nelle cellule CD8+ che è rilevabile anche in cellule CD8-). Se il controllo positivo non funziona, il test deve essere ripetuto. La stimolazione Ag-Sp nei pazienti non infetti è chiaramente negativa nei pannelli C-E-G. In ogni caso, è raccomandabile eseguire un'analisi dell'intervallo di normalità in ogni laboratorio. Per quanto riguarda invece i pazienti positivi al test (pannelli D-F-H), la risposta viene fornita in termini di frequenza percentuale e per mmc di sangue periferico interfacciando i risultati con il valore dei linfociti/mmc di sangue fornito dalla formula leucocitaria ottenuta dall'analisi di laboratorio dell'emocromo. Per esempio, considerando un valore di emocromo dei linfociti pari a 2000 cellule/mmc, la risposta per il paziente D sarà:

Positivo per la presenza di linfociti T specifici per il CMV

Frequenza= 0.97%

Valore assoluto=(0.97 x 2000 / 100)=19.4 cellule/mmc.

Considerando un valore di emocromo dei linfociti pari a 1500 cellule/mmc, la risposta per il paziente F sarà:

Positivo per la presenza di linfociti T specifici per HIV

Frequenza= 0.84%

Valore assoluto=(0.84 x 1500 / 100)=12.6 cellule/mmc

Considerando un valore di emocromo dei linfociti pari a 2600 cellule/mmc, la risposta per il paziente H sarà:

Positivo per la presenza di linfociti T specifici per HIV

Frequenza= 0.49%

Valore assoluto=(0.49 x 2600 / 100)=12.7 cellule/mmc

Esempio 3: Descrizione della procedura di impiego di un estratto antigenico crudo, di proteine purificate o ricombinanti o di una miscela di peptidi quali formulazioni Ag-Sp.

Le preparazioni Ag-Sp possono essere classificate in tre categorie principali, a seconda del livello di purificazione e di selezione dell'antigene: (a) estratti proteici crudi, (b) proteine purificate o ricombinanti e (c) miscele di peptidi.

(a) A scopo di esempio è riportata la metodologia di purificazione di un estratto antigenico da fibroblasti o cellule VERO infettati con il virus vaccinico. Le cellule sensibili all'infezione vengono trasferite in una provetta contenente virus vaccinico ad una molteplicità di infezione (MOI)=100. L'incubazione viene eseguita a 37° C sino ad ottenere il 50% di effetto citopatico. La centrifugazione a 850g x 15 min. è seguita dalla fissazione in 100 ml di PFA al 2% per 10 min. a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS, il campioni cellulari vengono sonicati per 20 min. a 4°C in PBS, centrifugati a 850xg per 15 min. a 4°C, ed aliquote di estratto antigenico crudo possono quindi essere congelate. La diluizione ottimale da impiegare nel test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp deve essere titolata ogni volta che viene eseguita una nuova preparazione antigenica. Come controllo negativo, viene prodotto un estratto antigenico crudo di cellule non infette eseguendo la medesima procedura. Lo stesso tipo di risultati può essere ottenuto utilizzando una

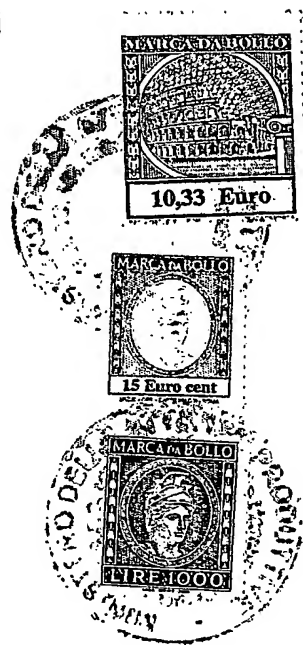
preparazione antigenica disponibile a livello commerciale per l'esecuzione del test ELISA (nel caso del virus vaccinico ad esempio può essere utilizzata una preparazione antigenica virale prodotta dalla ditta Maine Biotechnological Service, Portland, ME, Figura 3, pannelli A-C; nel caso del citomegalovirus ad esempio può essere utilizzata una preparazione antigenica virale prodotta dalla Biowhittaker, Walkersville, MD; Figura 2, pannelli C-D, e Figura 3, pannelli D-F).

(b) Lo stesso tipo di risultati precedentemente descritti può essere ottenuto utilizzando proteine purificate o ricombinanti generate in laboratorio o direttamente disponibili a livello commerciale (nel caso del virus dell'immunodeficienza umana HIV ad esempio è disponibile la proteina ricombinante GAG prodotta dalla ditta ProteinScience, Meridien, CT; i risultati ottenuti tramite l'impiego di questa preparazione Ag-Sp sono riportati in Figura 2, pannelli E-F).

(c) A scopo di esempio, è inoltre descritta la possibilità di utilizzare dei peptidi promiscui selezionati basandosi sulle regioni più conservate della proteina Gag del core di HIV. Questi epitopi sono stati determinati considerando la variabilità nei sottotipi di HIV per l'epitopo selezionato e le regole di processazione delle proteine mediate dal proteasoma. Tutti i peptidi sintetici sono purificati tramite cromatografia in fase inversa sino ad ottenere una purezza >90%. Le sequenze e la purezza dei peptidi è inoltre confermata tramite spettrometria di massa. L'insieme di questi peptidi è quindi utilizzato come stimolo antigenico sotto forma di una miscela di peptidi contenente anche gli opportuni costimoli. I risultati ottenuti tramite l'impiego di questa preparazione Ag-Sp sono riportati in

Figura 2; pannelli G-H). In particolare, l'elenco dei peptidi selezionati per la miscela Ag-Sp della proteina Gag di HIV è riportato in seguito:

SEQ ID NO 1	HIV-GAG 01	EKIRLRPGGKKKYRL
SEQ ID NO 2	HIV-GAG 02	PGGKKKYRLKHLVWA
SEQ ID NO 3	HIV-GAG 03	PGGKKKYRMKHLVWA
SEQ ID NO 4	HIV-GAG 04	KKYRMKHLVWASREL
SEQ ID NO 5	HIV-GAG 05	KHLVWASRELERFAV
SEQ ID NO 6	HIV-GAG 06	RELERFAVNPGLLET
SEQ ID NO 7	HIV-GAG 07	RELERFAVDPGLLET
SEQ ID NO 8	HIV-GAG 08	SAPKTGTEELRSLYN
SEQ ID NO 9	HIV-GAG 09	SLYNTVAVLYCVHQR
SEQ ID NO 10	HIV-GAG 10	SPRTLNAWVKVIEEK
SEQ ID NO 11	HIV-GAG 11	SPEVIPMFSALEGA
SEQ ID NO 12	HIV-GAG 12	ATPQDLNMMLNIVGG
SEQ ID NO 13	HIV-GAG 13	ATPQDLNTMLNIVGG
SEQ ID NO 14	HIV-GAG 14	QDLNMMLNIVGGHQA
SEQ ID NO 15	HIV-GAG 15	MMLNIVGGHQAAMQM
SEQ ID NO 16	HIV-GAG 16	SNPPIPVGDIYKRWI
SEQ ID NO 17	HIV-GAG 17	KRWIILGLNKIVRMY
SEQ ID NO 18	HIV-GAG 18	LGLNKIVRMYSVSI
SEQ ID NO 19	HIV-GAG 19	LGLNKIVRMYSPTSI
SEQ ID NO 20	HIV-GAG 20	RMYSVPSILDIKQGP



Tutte le diverse preparazioni Ag-Sp (di tipo a,b,c) composte da un estratto antigenico crudo, da proteine purificate o ricombinanti o da una miscela di peptidi, sono fornite sotto forma di liofilizzato nel kit

diagnostico. Le preparazioni Ag-Sp vengono utilizzati ad una concentrazione titolata solitamente nel range di 1-10g/ml. Le preparazioni Ag-Sp contengono inoltre gli opportuni costimoli composti dagli anticorpi anti-CD28 ed anti-CD49d utilizzati alla concentrazione finale di 1 µg/ml. Ogni nuovo lotto di preparazioni Ag-Sp + costimoli viene testato ed aliquotato in tubi "eppendorf". I tubi vengono poi posti nel liofilizzatore (Speedvac) fino a completa evaporazione del liquido (20 min). Al momento dell'uso ciascuna mix viene ricostituita mediante l'aggiunta di DMSO (concentrazione finale 0,1%) e soluzione salina, e aggiunta al tubo contenente le cellule da analizzare.

Esempio 4: Selezione di una miscela di peptidi quale formulazione Ag-Sp per eseguire una immunodiagnosi della SARS e di altre patologie infettive.

Nel seguente esempio è riportata la definizione di miscele di peptidi (PepMix) per eseguire il test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp nelle seguenti malattie infettive: citomegalovirus, SARS, vaiolo, carbonchio (bacillo dell'antrace). Come descritto nell'esempio 3, tale procedura e relativa applicazione possono essere estese a qualsiasi patologia infettiva di cui sia noto un antigene associato. A titolo di esempio, è quindi riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per il citomegalovirus (CMV). I peptidi sono stati disegnati dalla sequenza consenso della proteina p66. La seguente PepMix è composta da quindicimeri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 21 CMV-p66 01 - NSSRHSGKCRRQRRAL

SEQ ID NO 22	CMV-p66	02 - ALSAPPLTFLATTTT
SEQ ID NO 23	CMV-p66	03 - RQPRVHRGTYHLIQL
SEQ ID NO 24	CMV-p66	04 - TYHLIQLHLDLRPEEL
SEQ ID NO 25	CMV-p66	05 - RPEELRDPFQILLST
SEQ ID NO 26	CMV-p66	06 - SDVRPAFSLFPARPG
SEQ ID NO 27	CMV-p66	07 - FPARPGCHILRSVID
SEQ ID NO 28	CMV-p66	08 - ILRSVIDQQLTRMAI
SEQ ID NO 29	CMV-p66	09 - FALRIITPPLKRVPL
SEQ ID NO 30	CMV-p66	10 - TDADLTPTLTVRVRH
SEQ ID NO 31	CMV-p66	11 - ISGPRGLTSRISARL
SEQ ID NO 32	CMV-p66	12 - DPNESPPDLTLSSLTL
SEQ ID NO 33	CMV-p66	13 - TLYQDGMLRFNVTCD
SEQ ID NO 34	CMV-p66	14 - TEAPADPVAFRLRLR
SEQ ID NO 35	CMV-p66	15 - FRLRLRRETVRRPFF
SEQ ID NO 36	CMV-p66	16 - RRPFFSDAPLPYFVP
SEQ ID NO 37	CMV-p66	17 - DEGLEVRVPYELTLK
SEQ ID NO 38	CMV-p66	18 - RIYRRFYGPYLGVFV
SEQ ID NO 39	CMV-p66	19 - YLGVFVPHNRQGLKM
SEQ ID NO 40	CMV-p66	20 - LKMPVTVWLPRSWLE
SEQ ID NO 41	CMV-p66	21 - TVWLPRSWLELTVLV
SEQ ID NO 42	CMV-p66	22 - ATFPRDALLGRLYFI
SEQ ID NO 43	CMV-p66	23 - ALLGRLYFISSKHTL

A titolo di esempio, è riportata inoltre la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per il SARS coronavirus (SCV) umano utilizzando le

sequenze proteiche del ceppo Urbani. I peptidi sono stati disegnati dalle sequenze delle proteine S, M, E e N. In relazione alla distribuzione geografica dell'epidemia, è stata eseguita una selezione basata sulle caratteristiche genetiche della popolazione asiatica o caucasica. Entrambe le PepMix sono composte da quindicimeri e sono specifiche per i linfociti T CD8.

A- SARS Pepmix selezionata per la popolazione asiatica.

SEQ ID NO 44	SCV-E	01	NSVLLFLAFVVFLLV
SEQ ID NO 45	SCV-M	02	LAWIMLLQFAYSNRN
SEQ ID NO 46	SCV-M	03	MESELVIGAVIIRGH
SEQ ID NO 47	SCV-N	04	GKMKELSPRWYFYFL
SEQ ID NO 48	SCV-N	05	QQQQGQTVTKKSAAE
SEQ ID NO 49	SCV-S	06	THTMIFDNAFNCTFE
SEQ ID NO 50	SCV-S	07	CSVKSFEIDKGIYQT
SEQ ID NO 51	SCV-S	08	NCVADYSVLYNSTFF
SEQ ID NO 52	SCV-S	09	IAPGQTGVIADYNYK
SEQ ID NO 53	SCV-S	10	VSLLRSTSQKSIVAY
SEQ ID NO 54	SCV-S	11	SITTEVMPVSMAKTS
SEQ ID NO 55	SCV-S	12	QVKQMYKTPTLKYFG
SEQ ID NO 56	SCV-S	13	QIPFAMQMAYRFNGI
SEQ ID NO 57	SCV-S	14	ISSVLNDILSRDLKV
SEQ ID NO 58	SCV-S	15	RLDKVEAEVQIDRLI

B- SARS Pepmix selezionata per la popolazione caucasica

SEQ ID NO 59	SCV-E	01	LLFLAFVVFLLVTLA
SEQ ID NO 60	SCV-M	02	MACIVGLMWLSYFVA

SEQ ID NO 61	SCV-M	03	PLMESELVIGAVIIR
SEQ ID NO 62	SCV-N	04	KMKELSPRWYFYLLG
SEQ ID NO 63	SCV-N	05	ETALALLLLDRLNQL
SEQ ID NO 64	SCV-S	06	YFVGYLKPTTFMLKY
SEQ ID NO 65	SCV-S	07	SNCVADYSVLYNSTF
SEQ ID NO 66	SCV-S	08	RDPKTSEILDSPCS
SEQ ID NO 67	SCV-S	09	GSFCTQLNRALSGIA
SEQ ID NO 68	SCV-S	10	VKQMYKTPTLKYFGG
SEQ ID NO 69	SCV-S	11	AGFMKQYGECLGDIN
SEQ ID NO 70	SCV-S	12	PPLLTDDMIAAYTAA
SEQ ID NO 71	SCV-S	13	ISSVLNDILSRLDKV
SEQ ID NO 72	SCV-S	14	TQQLIRAAEIRASAN
SEQ ID NO 73	SCV-S	15	LDSFKEELDKYFKNH

Sempre a titolo di esempio, è riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per bacillo dell'antrace (Ba). La seguente PepMix è composta da quindicimeri ed è specifica per i linfociti T CD4.

SEQ ID NO 74	Ba-PA	01 - ESESSSQGLLGYYFS
SEQ ID NO 75	Ba-PA	02 - NIPSENQYFQSAIWS
SEQ ID NO 76	Ba-PA	03 - QYQRENPTKGLDFK
SEQ ID NO 77	Ba-PA	04 - ISNIHEKKGLTKYKS
SEQ ID NO 78	Ba-PA	05 - VSPEARHPLVAAYPI
SEQ ID NO 79	Ba-PA	06 - PIYNVLPTTSLVLGK
SEQ ID NO 80	Ba-PA	07 - KAKENQLSQILAPNN
SEQ ID NO 81	Ba-PA	08 - QVYGNIATYNFENGR

SEQ ID NO 82 Ba-PA 09 - NIDKDIRKILSGYIV

SEQ ID NO 83 Ba-PA 10 - FIDFKKYNDKLPYI

Sempre a titolo di esempio, è riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per gli orthopoxvirus (OPV) incluso il vaiolo. La seguente PepMix è composta da quindicimeri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 84	OPV-A10L	01	SKNEAEKLITSAFDL
SEQ ID NO 85	OPV-A10L	02	RQSSCKMALLFKNLA
SEQ ID NO 86	OPV-A27	03	ICLKDKSELYSAYKT
SEQ ID NO 87	OPV-A27	04	TRERNKIVELEKELN
SEQ ID NO 88	OPV-A33R	05	ICIRISMVISLLSMI
SEQ ID NO 89	OPV-A33R	06	GLYYQGSCYIFHSDY
SEQ ID NO 90	OPV-A33R	07	TLPNKSDVLTTLWLID
SEQ ID NO 91	OPV-C7L	08	GHSETDTTTEYLLPN
SEQ ID NO 92	OPV-C7L	09	GPSTYYPHYKSCALV
SEQ ID NO 93	OPV-D8L	10	TSPARENYFMRWLSD
SEQ ID NO 94	OPV-E3L	11	REVNKALYDLQRSAM
SEQ ID NO 95	OPV-E3L	12	VIPAKKIIDWKNANP
SEQ ID NO 96	OPV-H3L	13	MASLLYFILFLFVC
SEQ ID NO 97	OPV-H3L	14	IFTDASTVASAQIYL
SEQ ID NO 98	OPV-H6R	15	TSHLNPSIEKHVGIY
SEQ ID NO 99	OPV-H6R	16	LSAKVYMLENIQVMK
SEQ ID NO 100	OPV-K1L	17	TYHLENDKIEDLINQ
SEQ ID NO 101	OPV-K1L	18	DSMYVIPDELIDVLK
SEQ ID NO 102	OPV-M1R	19	AYVPAMFTAALNIQT



SEQ ID NO 103 OPV-M1R 20 VIGVIL AALFMYYA

Esempio 5: Selezione di una miscela di peptidi quale formulazione Ag-Sp per eseguire una immunodiagnosi della patologie neoplastiche utilizzando antigeni tumore-associati.

Nel seguente esempio è riportata la definizione di miscele di peptidi (PepMix) per eseguire il test di immunodiagnosi dei linfociti T Ag-Sp nelle patologie neoplastiche in cui sia rilevante la determinazione dei seguenti antigeni-tumore associati: alfa-fetoproteina, PSA, MAGE-3, NY-ESO-1. Come descritto nell'esempio 3, tale procedura e relativa applicazione possono essere estese a qualsiasi patologia neoplastica di cui sia noto un antigene specifico. A titolo di esempio, è quindi riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per l'alfa-fetoproteina (AFP). I peptidi sono stati disegnati dalla sequenza consenso della proteina. La seguente PepMix è composta da nonameri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 104	AFP 01	KGEEELQKY
SEQ ID NO 105	AFP 02	FTEIQKLV
SEQ ID NO 106	AFP 03	FTESRTLHR
SEQ ID NO 107	AFP 04	SSLVDETY
SEQ ID NO 108	AFP 05	ITECCKLTT
SEQ ID NO 109	AFP 06	FSDDKFIFH
SEQ ID NO 110	AFP 07	ETFMNKFY
SEQ ID NO 111	AFP 01	SSELMATR
SEQ ID NO 112	AFP 08	AEEGQKLIS

SEQ ID NO 113	AFP	09	WVESIFLIF
SEQ ID NO 114	AFP	10	IADFSGLLE
SEQ ID NO 115	AFP	11	SRTLHRNEY
SEQ ID NO 116	AFP	12	AQFVQEATY
SEQ ID NO 117	AFP	13	FLASFVHEY
SEQ ID NO 118	AFP	14	VILRVAKGY
SEQ ID NO 119	AFP	15	IQESQALAK
SEQ ID NO 120	AFP	16	ITEEQLEAV
SEQ ID NO 121	AFP	17	HEKEILEKY
SEQ ID NO 122	AFP	18	QSEEGRHNC

Sempre a titolo di esempio, è riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per il PSA. I peptidi sono stati disegnati dalla sequenza consenso della proteina. La seguente PepMix è composta da nonameri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 123	PSA	01	LSEPAELTD
SEQ ID NO 124	PSA	02	GSEPCALPE
SEQ ID NO 125	PSA	03	SHSFPHPLY
SEQ ID NO 126	PSA	04	SPECIFICA
SEQ ID NO 127	PSA	05	ASESEMINI
SEQ ID NO 128	PSA	06	ESEMININP
SEQ ID NO 129	PSA	07	LTDVAVKMD
SEQ ID NO 130	PSA	08	ALPERPSLY
SEQ ID NO 131	PSA	09	SLYTKVVHY
SEQ ID NO 132	PSA	10	ATESPECIF

SEQ ID NO 133	PSA	11	RTEINKALL
SEQ ID NO 134	PSA	12	EMENGELAS
SEQ ID NO 135	PSA	13	LYDMSLLKN
SEQ ID NO 136	PSA	14	SHDLMLLRL
SEQ ID NO 137	PSA	15	SIEPEEFLT
SEQ ID NO 138	PSA	16	RTEINSEME
SEQ ID NO 139	PSA	17	EPALGTTCTY
SEQ ID NO 140	PSA	18	SGDSGGPLV
SEQ ID NO 141	PSA	19	LPERPSLYT
SEQ ID NO 142	PSA	20	ASEMINPRT

Sempre a titolo di esempio, è riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per il MAGE-3. I peptidi sono stati disegnati dalla sequenza consenso della proteina. La seguente PepMix è composta da nonameri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 143	MAGE-3	01	EVDPIGHLY
SEQ ID NO 144	MAGE-3	02	SSLPTTMNY
SEQ ID NO 145	MAGE-3	03	ISGGPHISY
SEQ ID NO 146	MAGE-3	04	LVHFLLLY
SEQ ID NO 147	MAGE-3	05	FATCLGLSY
SEQ ID NO 148	MAGE-3	06	GSVVGWNQY
SEQ ID NO 149	MAGE-3	07	LGDPKLLT
SEQ ID NO 150	MAGE-3	08	FVQENYLEY
SEQ ID NO 151	MAGE-3	09	GENFAMILY
SEQ ID NO 152	MAGE-3	10	ATEEQEAAS

SEQ ID NO 153	MAGE-3	11	ATEDANTIG
SEQ ID NO 154	MAGE-3	12	RGEALGLVG
SEQ ID NO 155	MAGE-3	13	ESEFQAALS
SEQ ID NO 156	MAGE-3	14	GSDPACYEF
SEQ ID NO 157	MAGE-3	15	SPDPPQSPQ

Sempre a titolo di esempio, è infine riportata la selezione di una miscela di peptidi da utilizzare come Ag-Sp nel test di immunodiagnosi dei linfociti T specifici per l'antigene NY-ESO-1. I peptidi sono stati disegnati dalla sequenza consenso della proteina. La seguente PepMix è composta da nonameri ed è specifica per i linfociti T CD8.

SEQ ID NO 158	NY-ESO-1	01	GIEMCAANY
SEQ ID NO 159	NY-ESO-1	02	AQDAPPLPV
SEQ ID NO 160	NY-ESO-1	03	AADHRQLQL
SEQ ID NO 161	NY-ESO-1	04	RTEINHMSA
SEQ ID NO 162	NY-ESO-1	05	GPESRLLEF
SEQ ID NO 163	NY-ESO-1	06	FTVSGNILT
SEQ ID NO 164	NY-ESO-1	07	PESRLLEFY
SEQ ID NO 165	NY-ESO-1	08	LPVPGVLLK
SEQ ID NO 166	NY-ESO-1	09	CFLPVFLAQ
SEQ ID NO 167	NY-ESO-1	10	SSCLQQLSL
SEQ ID NO 168	NY-ESO-1	11	DADGPGGPG
SEQ ID NO 169	NY-ESO-1	12	IPDGPGGNA
SEQ ID NO 170	NY-ESO-1	13	LLEFY Lamp
SEQ ID NO 171	NY-ESO-1	14	NYESP RTEI
SEQ ID NO 172	NY-ESO-1	15	QAEGRG TGG



Nell'esempio 3, in relazione ai peptidi HIV-specifici, la selezione dei peptidi mediante la procedura è stata validata in laboratorio. La selezione dei peptidi indicati negli esempi presenti è stata effettuata mediante gli stessi criteri indicati nell'esempio 3 e che, validati in laboratorio per l'HIV, devono quindi ritenersi validi per qualsiasi altra applicazione.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di immunodiagnosi in vitro per la determinazione dei linfociti T antigene-specifici (Ag-Sp), detto metodo comprendendo i seguenti stadi: (i) isolamento di cellule mononucleate (PBMC) da un campione di sangue venoso umano o animale, (ii) stimolazione con una preparazione Ag-Sp sotto forma di estratto antigenico crudo, proteina purificata o ricombinante o miscela di peptidi, (iii) incubazione, (iv) colorazione in immunofluorescenza, (v) acquisizione ed analisi al citofluorimetro, (vi) elaborazione della risposta.
2. Metodo secondo la riv. 1 in cui le PBMC sono isolate da un'aliquota di sangue venoso tramite centrifugazione su gradiente di densità.
3. Metodo secondo la riv. 1 in cui la miscela di peptidi è scelta fra: miscela per la proteina Gag di HIV comprendente i peptidi da SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 20; miscela per il citomegalovirus comprendente i peptidi da SEQ ID NO 21 a SEQ ID NO 43; miscela per la SARS coronavirus A-SARS (popolazione asiatica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 44 a SEQ ID NO 58; miscela per la SARS coronavirus B-SARS (popolazione caucasica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 59 a SEQ ID NO 73; miscela per il bacillo dell'antrace comprendente i peptidi da SEQ ID NO 74 a SEQ ID NO 83; miscela per gli orthopoxvirus incluso il vaiolo comprendente i peptidi da SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 103; miscela per l'alfa-fetoproteina comprendente i peptidi da SEQ ID NO 104 a SEQ ID NO 122; miscela per il PSA comprendente i peptidi da SEQ ID NO 123 a SEQ ID NO 142; miscela per il MAGE-3 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 143 a SEQ ID NO 157; miscela

per l'antigene NY-ESO-1 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 158 a SEQ ID NO 172.

4. Metodo secondo la riv. 1 in cui l'incubazione è condotta a circa 37 °C per circa un'ora seguita da ulteriori circa 5 ore in presenza di un potente inibitore della secrezione cellulare.
5. Metodo secondo la riv. 1 in cui per l'analisi al citofluorimetro si effettua una misurazione selettiva dei linfociti T Ag-Sp impiegando: a) anticorpi monoclonali che si legano sulla superficie cellulare dei linfociti T e delle loro sottopopolazioni; b) anticorpi monoclonali che si legano alle citochine che si accumulano a livello intracellulare in seguito alla stimolazione con l'antigene; miscele di a) e b).
6. Metodo secondo la riv. 5 in cui gli anticorpi di a) sono scelti fra anti-CD3 e anti-CD45 e relative miscele quale configurazione minima, a cui sostituire o aggiungere uno o più scelti fra anti- CD4, CD8, CD25, CD27, CD38, CD45-RA, CD45-RO, CD69, CCR5, CCR7.
7. Metodo secondo la riv. 5 in cui gli anticorpi di b) sono scelti fra quelli che rilevano la presenza di almeno una fra le seguenti citochine intracellulari: interferone-gamma, IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, e relative miscele.
8. Kit per la conduzione del metodo di immunodiagnosi secondo le riv. 1-7 comprendente, eventualmente in forma liofilizzata, i componenti seguenti: °
 - preparazione Ag-Sp e relative preparazioni di controllo negativo e positivo
 - reagenti quali soluzioni di lavaggio e permeabilizzazione

/ 102

- reagenti quali miscele di anticorpi monoclonali
 - pipette e altro materiale da laboratorio
 - istruzioni per la conduzione del test
9. Kit secondo la riv. 8 per la determinazione di antigeni associati a malattie che coinvolgono il sistema immunitario attraverso l'attivazione dei linfociti T.
10. Kit secondo la riv. 8 per la determinazione di antigeni associati a malattie infettive, autoimmuni, allergiche (allergeni) e neoplastiche (antigeni tumore-associati).
11. Kit secondo la riv. 8 per la determinazione di antigeni associati ad una fra le seguenti malattie: citomegalovirus, SARS, vaiolo, carbonchio (bacillo dell'antrace).
12. Composizione per immunodiagnosi in vitro comprendente una miscela di peptidi scelta fra: miscela per la proteina Gag di HIV comprendente i peptidi da SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 20; miscela per il citomegalovirus comprendente i peptidi da SEQ ID NO 21 a SEQ ID NO 43; miscela per la SARS coronavirus A-SARS (popolazione asiatica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 44 a SEQ ID NO 58; miscela per la SARS coronavirus B-SARS (popolazione caucasica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 59 a SEQ ID NO 73; miscela per il bacillo dell'antrace comprendente i peptidi da SEQ ID NO 74 a SEQ ID NO 83; miscela per gli orthopoxvirus incluso il vaiolo comprendente i peptidi da SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 103; miscela per l'alfa-fetoproteina comprendente i peptidi da SEQ ID NO 104 a SEQ ID NO 122; miscela per il PSA comprendente i peptidi da SEQ ID NO 123 a SEQ ID NO 142;



miscela per il MAGE-3 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 143 a SEQ ID NO 157; miscela per l'antigene NY-ESO-1 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 158 a SEQ ID NO 172.

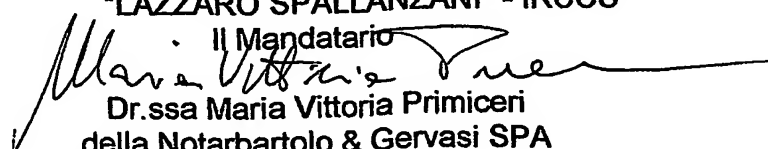
13. Impiego di una miscela di peptidi scelta fra: miscela per la proteina Gag di HIV comprendente i peptidi da SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 20; miscela per il citomegalovirus comprendente i peptidi da SEQ ID NO 21 a SEQ ID NO 43; miscela per la SARS coronavirus A-SARS (popolazione asiatica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 44 a SEQ ID NO 58; miscela per la SARS coronavirus B-SARS (popolazione caucasica) comprendente i peptidi da SEQ ID NO 59 a SEQ ID NO 73; miscela per il bacillo dell'antrace comprendente i peptidi da SEQ ID NO 74 a SEQ ID NO 83; miscela per gli orthopoxvirus incluso il vaiolo comprendente i peptidi da SEQ ID NO 84 a SEQ ID NO 103; miscela per l'alfa-fetoproteina comprendente i peptidi da SEQ ID NO 104 a SEQ ID NO 122; miscela per il PSA comprendente i peptidi da SEQ ID NO 123 a SEQ ID NO 142; miscela per il MAGE-3 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 143 a SEQ ID NO 157; miscela per l'antigene NY-ESO-1 comprendente i peptidi da SEQ ID NO 158 a SEQ ID NO 172; per immunodiagnosi in vitro.

/PV

Roma, 01 Agosto 2003

Per ISTITUTO NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE
"LAZZARO SPALLANZANI" - IRCCS

Il Mandatario


Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri
della Notarbartolo & Gervasi SPA



ELENCO SEQUENZE

RM 2003 A 000386

SEQ ID NO 1	HIV-GAG 01	EKIRLRPGGKKKYRL
SEQ ID NO 2	HIV-GAG 02	PGGKKKYRLKHLVWA
SEQ ID NO 3	HIV-GAG 03	PGGKKKYRMKHLVWA
SEQ ID NO 4	HIV-GAG 04	KKYRMKHLVWASREL
SEQ ID NO 5	HIV-GAG 05	KHLVWASRELERFAV
SEQ ID NO 6	HIV-GAG 06	RELERFAVNPGLLET
SEQ ID NO 7	HIV-GAG 07	RELERFAVDPGLLET
SEQ ID NO 8	HIV-GAG 08	SAPKTGTEELRSLYN
SEQ ID NO 9	HIV-GAG 09	SLYNTVAVLYCVHQR
SEQ ID NO 10	HIV-GAG 10	SPRTLNAWVKVIEEK
SEQ ID NO 11	HIV-GAG 11	SPEVIPMFSALSEGA
SEQ ID NO 12	HIV-GAG 12	ATPQDLNMMLNIVGG
SEQ ID NO 13	HIV-GAG 13	ATPQDLNTMLNIVGG
SEQ ID NO 14	HIV-GAG 14	QDLNMMLNIVGGHQA
SEQ ID NO 15	HIV-GAG 15	MMLNIVGGHQAAMQM
SEQ ID NO 16	HIV-GAG 16	SNPPIPVGDIYKRWI
SEQ ID NO 17	HIV-GAG 17	KRWIILGLNKIVRMY
SEQ ID NO 18	HIV-GAG 18	LGLNKIVRMYSVSI
SEQ ID NO 19	HIV-GAG 19	LGLNKIVRMYSPTSI
SEQ ID NO 20	HIV-GAG 20	RMYSVVSILDIKQGP
SEQ ID NO 21	CMV-p66	01 - NSSRHSGKCRRQRRAL
SEQ ID NO 22	CMV-p66	02 - ALSAPPLTFLATTTT
SEQ ID NO 23	CMV-p66	03 - RQPRVHRGTYHLIQL
SEQ ID NO 24	CMV-p66	04 - TYHLIQLHLDLRPEEL
SEQ ID NO 25	CMV-p66	05 - RPEELRDPFQILLST
SEQ ID NO 26	CMV-p66	06 - SDVRPAFSLFPARPG
SEQ ID NO 27	CMV-p66	07 - FPARPGCHILRSVID
SEQ ID NO 28	CMV-p66	08 - ILRSVIDQQLTRMAI
SEQ ID NO 29	CMV-p66	09 - FALRIITPPLKRVPL
SEQ ID NO 30	CMV-p66	10 - TDADLTPTLTVRVRH
SEQ ID NO 31	CMV-p66	11 - ISGPRGLTSRISARL

SEQ ID NO 32	CMV-p66	12 - DPNESPPDLTLSSLTL
SEQ ID NO 33	CMV-p66	13 - TLYQDGMLRFNVTCD
SEQ ID NO 34	CMV-p66	14 - TEAPADPVAFRLRLR
SEQ ID NO 35	CMV-p66	15 - FRLRLRRETVRRPFF
SEQ ID NO 36	CMV-p66	16 - RRPFFSDAPLPYFVP
SEQ ID NO 37	CMV-p66	17 - DEGLEVRVPYELTLK
SEQ ID NO 38	CMV-p66	18 - RIYRRFYGPYLGVFV
SEQ ID NO 39	CMV-p66	19 - YLGVFVPHNRQGLKM
SEQ ID NO 40	CMV-p66	20 - LKMPVTVWLPRSWLE
SEQ ID NO 41	CMV-p66	21 - TVWLPRSWLELTVLV
SEQ ID NO 42	CMV-p66	22 - ATFPRDALLGRLYFI
SEQ ID NO 43	CMV-p66	23 - ALLGRLYFISSKHTL
SEQ ID NO 44	SCV-E	01 NSVLLFLAFVVFLLV
SEQ ID NO 45	SCV-M	02 LAWIMLLQFAYSNRN
SEQ ID NO 46	SCV-M	03 MESELVIGAVIIRGH
SEQ ID NO 47	SCV-N	04 GKMKELSPRWYFYLL
SEQ ID NO 48	SCV-N	05 QQQQGQTVTKKSAAE
SEQ ID NO 49	SCV-S	06 THTMIFDNAFNCTFE
SEQ ID NO 50	SCV-S	07 CSVKSFEIDKGIYQT
SEQ ID NO 51	SCV-S	08 NCVADYSVLYNSTFF
SEQ ID NO 52	SCV-S	09 IAPGQTGVIADYNYK
SEQ ID NO 53	SCV-S	10 VSLLRSTSQKSIVAY
SEQ ID NO 54	SCV-S	11 SITTEVMPVSMAKTS
SEQ ID NO 55	SCV-S	12 QVKQMYKTPTLKYFG
SEQ ID NO 56	SCV-S	13 QIPFAMQMAYRFNGI
SEQ ID NO 57	SCV-S	14 ISSVLNDILSRLDKV
SEQ ID NO 58	SCV-S	15 RLDKVEAEVQIDRLI
SEQ ID NO 59	SCV-E	01 LLFLAFVVFLLVTLA
SEQ ID NO 60	SCV-M	02 MACIVGLMWLSYFVA
SEQ ID NO 61	SCV-M	03 PLMESELVIGAVIIR
SEQ ID NO 62	SCV-N	04 KMKELSPRWYFYLLG
SEQ ID NO 63	SCV-N	05 ETALALLLLDRLNQL
SEQ ID NO 64	SCV-S	06 YFVGYLKPTTFMLKY

4359PTIT

Notarbartolo & Gervasi SpA

SEQ ID NO 65	SCV-S	07	SNCVADYSVLYNSTF
SEQ ID NO 66	SCV-S	08	RDPKTSEILDISPCS
SEQ ID NO 67	SCV-S	09	GSFCTQLNRALSGIA
SEQ ID NO 68	SCV-S	10	VKQMYKTPTLKYFGG
SEQ ID NO 69	SCV-S	11	AGFMKQYGECLGDIN
SEQ ID NO 70	SCV-S	12	PPLLTDDMIAAYTAA
SEQ ID NO 71	SCV-S	13	ISSVLNDILSRLDKV
SEQ ID NO 72	SCV-S	14	TQQLIRAAEIRASAN
SEQ ID NO 73	SCV-S	15	LDSFKEELDKYFKNH
SEQ ID NO 74	Ba-PA	01	- ESESSSQGLLGYYFS
SEQ ID NO 75	Ba-PA	02	- NIPSENQYFQSAIWS
SEQ ID NO 76	Ba-PA	03	- QYQRENPTKGLDFK
SEQ ID NO 77	Ba-PA	04	- ISNIHEKKGLTKYKS
SEQ ID NO 78	Ba-PA	05	- VSPEARHPLVAAYPE
SEQ ID NO 79	Ba-PA	06	- PIYNVLPTTSLVLGK
SEQ ID NO 80	Ba-PA	07	- KAKENQLSQILAPNN
SEQ ID NO 81	Ba-PA	08	- QVYGNATYNFENGR
SEQ ID NO 82	Ba-PA	09	- NIDKDIRKILSGYIV
SEQ ID NO 83	Ba-PA	10	- FIDFKKYNDKLPLYI
SEQ ID NO 84	OPV-A10L	01	SKNEAEKLITSAFDL
SEQ ID NO 85	OPV-A10L	02	RQSSCKMALLFKNLA
SEQ ID NO 86	OPV-A27	03	ICLKDKSELYSAYKT
SEQ ID NO 87	OPV-A27	04	TRERNKIVELEKELN
SEQ ID NO 88	OPV-A33R	05	ICIRISMVISLLSMI
SEQ ID NO 89	OPV-A33R	06	GLYYQGSCYIFHSDY
SEQ ID NO 90	OPV-A33R	07	TLPNKSDVLTTLWLID
SEQ ID NO 91	OPV-C7L	08	GHSETDTTTEYLLPN
SEQ ID NO 92	OPV-C7L	09	GPSTYYPHYKSCALV
SEQ ID NO 93	OPV-D8L	10	TSPARENYFMRWLSO
SEQ ID NO 94	OPV-E3L	11	REVNKALYDLQRSAM
SEQ ID NO 95	OPV-E3L	12	VIPAKKIIDWKNANP
SEQ ID NO 96	OPV-H3L	13	MASLLYFILFLFVC
SEQ ID NO 97	OPV-H3L	14	IFTDASTVASAQIYL



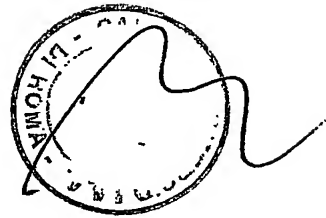
SEQ ID NO 98	OPV-H6R	15	TSHLNPSIEKHVGIY
SEQ ID NO 99	OPV-H6R	16	LSAKVYMLENIQVMK
SEQ ID NO 100	OPV-K1L	17	TYHLENDKIEDLINQ
SEQ ID NO 101	OPV-K1L	18	DSMYVIPDELIDVLK
SEQ ID NO 102	OPV-M1R	19	AYVPAMFTAALNIQT
SEQ ID NO 103	OPV-M1R	20	VIGVILAALFMYYA
SEQ ID NO 104	AFP 01		KGEEELQKY
SEQ ID NO 105	AFP 02		FTEIQKLV
SEQ ID NO 106	AFP 03		FTESRTLHR
SEQ ID NO 107	AFP 04		SSLVDETY
SEQ ID NO 108	AFP 05		ITECCKLTT
SEQ ID NO 109	AFP 06		FSDDKFIFH
SEQ ID NO 110	AFP 07		ETFMNKFY
SEQ ID NO 111	AFP 01		SSELMATR
SEQ ID NO 112	AFP 08		AEEGQKLIS
SEQ ID NO 113	AFP 09		WVESIFLIF
SEQ ID NO 114	AFP 10		IADFSGLLE
SEQ ID NO 115	AFP 11		SRTLHRNEY
SEQ ID NO 116	AFP 12		AQFVQEATY
SEQ ID NO 117	AFP 13		FLASFVHEY
SEQ ID NO 118	AFP 14		VILRVAKGY
SEQ ID NO 119	AFP 15		IQESQALAK
SEQ ID NO 120	AFP 16		ITEEQLEAV
SEQ ID NO 121	AFP 17		HEKEILEKY
SEQ ID NO 122	AFP 18		QSEEGRHNC
SEQ ID NO 123	PSA 01		LSEPAELTD
SEQ ID NO 124	PSA 02		GSEPCALPE
SEQ ID NO 125	PSA 03		SHSFPHPY
SEQ ID NO 126	PSA 04		SPECIFICA
SEQ ID NO 127	PSA 05		ASESEMINI
SEQ ID NO 128	PSA 06		ESEMININP
SEQ ID NO 129	PSA 07		LTDVAVKMD
SEQ ID NO 130	PSA 08		ALPERPSLY

SEQ ID NO 131	PSA	09	SLYTKVVHY
SEQ ID NO 132	PSA	10	ATESPECIF
SEQ ID NO 133	PSA	11	RTEINKALL
SEQ ID NO 134	PSA	12	EMENGELAS
SEQ ID NO 135	PSA	13	LYDMSLLKN
SEQ ID NO 136	PSA	14	SHDLMLLRL
SEQ ID NO 137	PSA	15	SIEPEEFLT
SEQ ID NO 138	PSA	16	RTEINSEME
SEQ ID NO 139	PSA	17	EPALGTTCY
SEQ ID NO 140	PSA	18	SGDSGGPLV
SEQ ID NO 141	PSA	19	LPERPSLYT
SEQ ID NO 142	PSA	20	ASEMINPRT
SEQ ID NO 143	MAGE-3	01	EVDPIGHL
SEQ ID NO 144	MAGE-3	02	SSLPTTMNY
SEQ ID NO 145	MAGE-3	03	ISGGPHISY
SEQ ID NO 146	MAGE-3	04	LVHFLLKY
SEQ ID NO 147	MAGE-3	05	FATCLGLSY
SEQ ID NO 148	MAGE-3	06	GSVVGWQY
SEQ ID NO 149	MAGE-3	07	LGDPKLLT
SEQ ID NO 150	MAGE-3	08	FVQENYLEY
SEQ ID NO 151	MAGE-3	09	GENFAMILY
SEQ ID NO 152	MAGE-3	10	ATEEQEAAS
SEQ ID NO 153	MAGE-3	11	ATEDANTIG
SEQ ID NO 154	MAGE-3	12	RGEALGLVG
SEQ ID NO 155	MAGE-3	13	ESEFQAALS
SEQ ID NO 156	MAGE-3	14	GSDPACYEF
SEQ ID NO 157	MAGE-3	15	SPDPPQSPQ
SEQ ID NO 158	NY-ESO-1	01	GIEMCAANY
SEQ ID NO 159	NY-ESO-1	02	AQDAPPLPV
SEQ ID NO 160	NY-ESO-1	03	AADHRQLQL
SEQ ID NO 161	NY-ESO-1	04	RTEINHMSA
SEQ ID NO 162	NY-ESO-1	05	GPESRLLEF
SEQ ID NO 163	NY-ESO-1	06	FTVSGNILT

4359PTIT

Notarbartolo & Gervasi SpA

SEQ ID NO 164	NY-ESO-1	07	PESRLLEFY
SEQ ID NO 165	NY-ESO-1	08	LPVPGVLLK
SEQ ID NO 166	NY-ESO-1	09	CFLPVFLAQ
SEQ ID NO 167	NY-ESO-1	10	SSCLQQLSL
SEQ ID NO 168	NY-ESO-1	11	DADGPGGPG
SEQ ID NO 169	NY-ESO-1	12	IPDGPGGNA
SEQ ID NO 170	NY-ESO-1	13	LLEFY LAMP
SEQ ID NO 171	NY-ESO-1	14	NYESPRTEI
SEQ ID NO 172	NY-ESO-1	15	QAEGRGTGG



PM 2003 A 000386

Un esempio illustrativo della procedura di
immunodiagnosi della reattività antigene-specifica

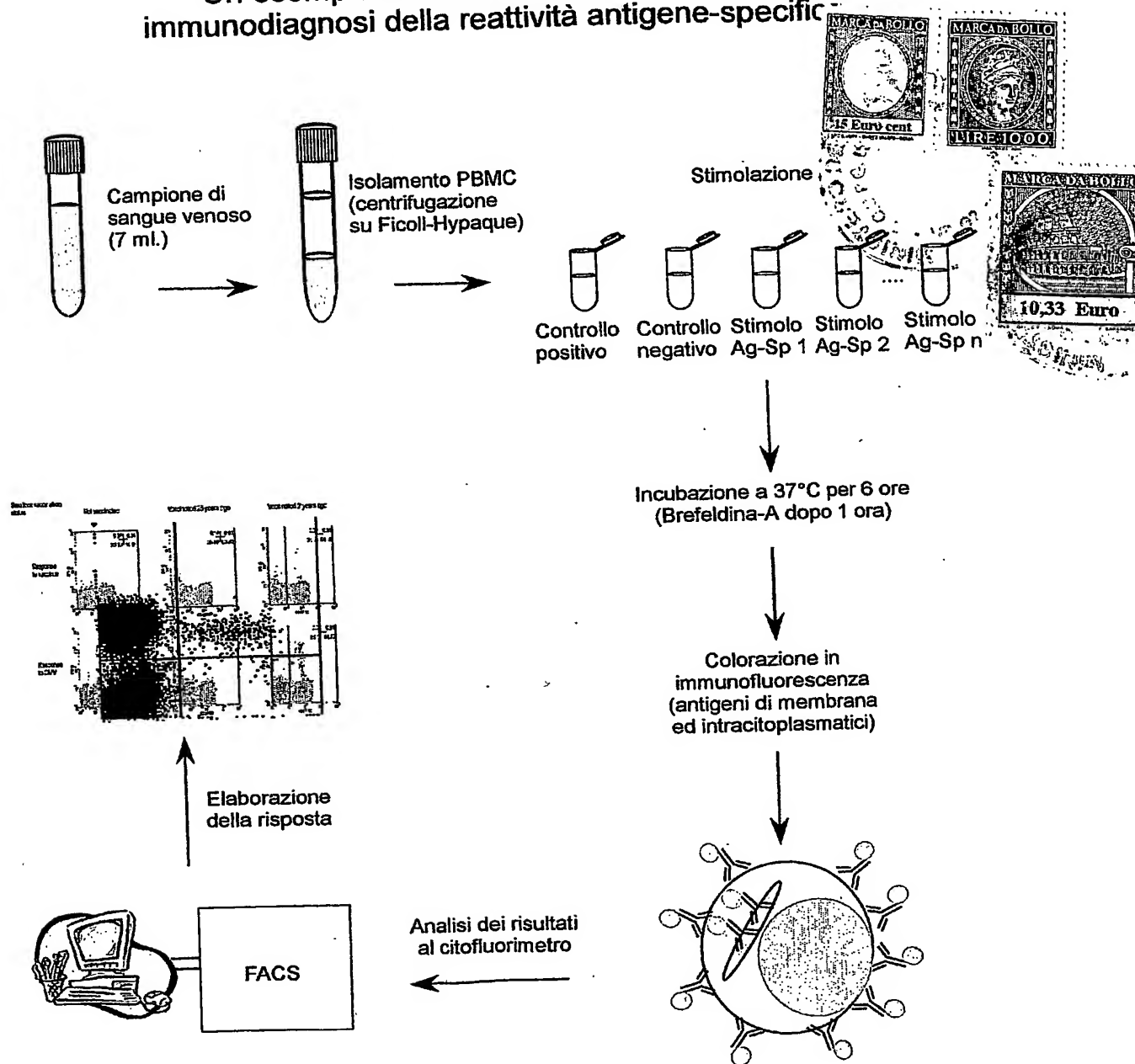
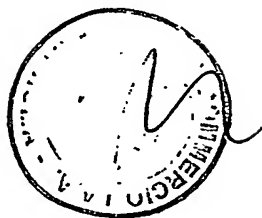


FIGURA 1



RM 2003 A 000386

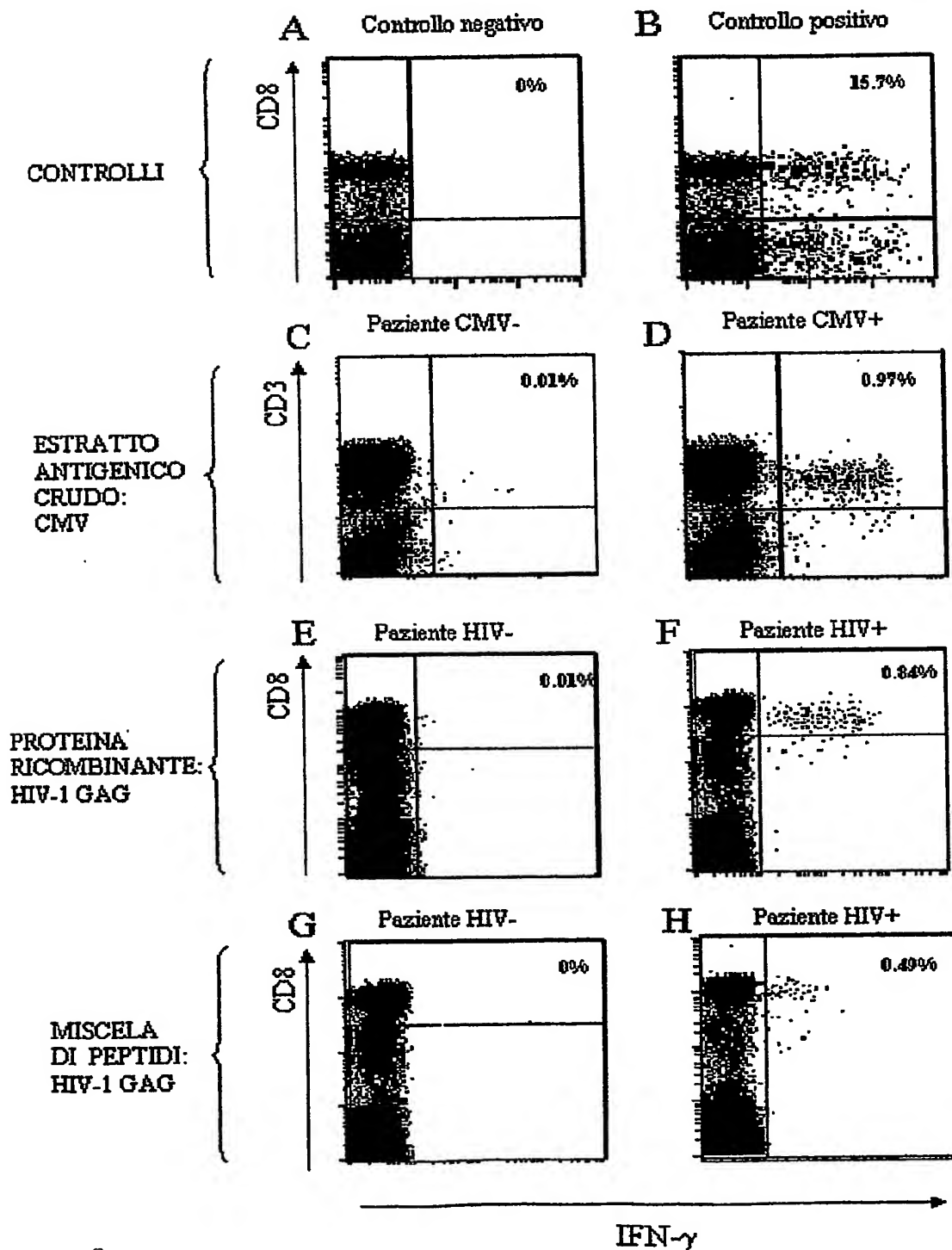
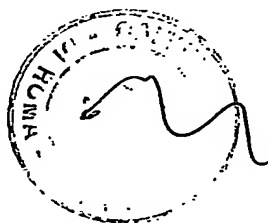


FIGURA 2



Condizione di vaccinazione anti vaiolosa

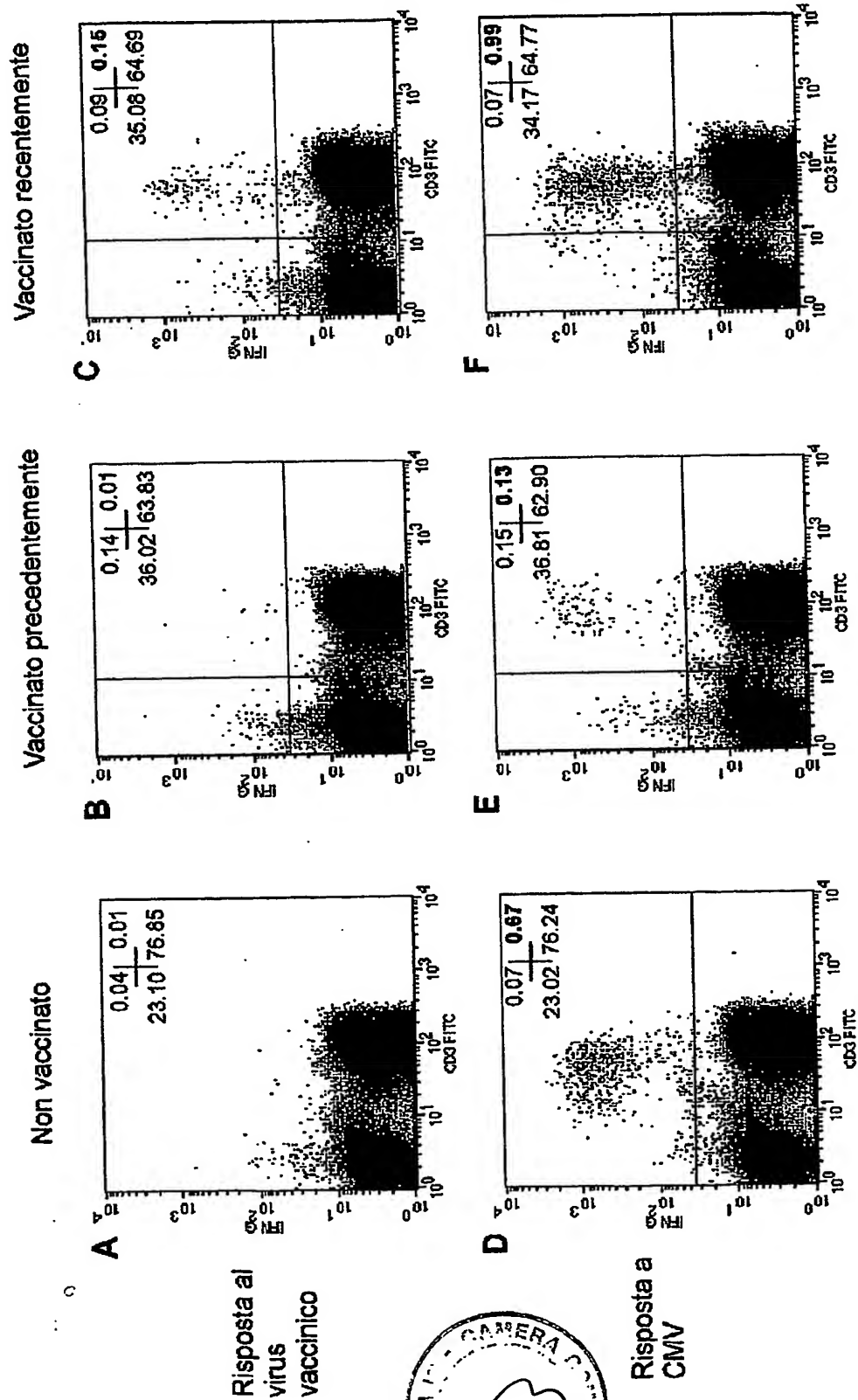


FIGURA 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.